



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE
CHALCONA SOBRE FITOPATÓGENOS DO GÊNERO
*Xanthomonas ssp.***

BRENDA LEITE MOUTINHO

2021



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

BRENDA LEITE MOUTINHO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE CHALCONA SOBRE
FITOPATÓGENOS DO GÊNERO *Xanthomonas* ssp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientador
Profa. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2021

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M934a Moutinho, Brenda Leite.
Atividade antimicrobiana de derivados de chalcona sobre fitopatógenos do gênero *Xanthomonas* ssp. / Brenda Leite Moutinho; orientadora Roberta Pereira Miranda Fernandes. – São Cristóvão, SE, 2021.
32 f.; il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. *Xanthomonas campestris*. 2. Estrutura molecular. 3. Fitopatologia. I. Fernandes, Roberta Pereira Miranda, orient. II. Título.

CDU 661.727

BRENDA LEITE MOUTINHO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE CHALCONA SOBRE
FITOPATÓGENOS DO GÊNERO *Xanthomonas ssp.***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Aprovada em 28 de janeiro de 2020.

Profa. Dra. Sona Arun Jain
Unit

Prof. Dr. Ricardo Sher
UFS

Profa. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*A todos os Orixás e aos trabalhadores da
Seara do Bem, aos meus familiares e amigos,
principalmente aos componentes do LabEnz*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente à professora Dr^a. Roberta Fernandes, que desde 2013 vem me ensinando e orientando, não só sobre ciência, mas a tirar o melhor do que a vida nos oferece. Eu tenho a professora como uma inspiração para toda a vida, sinônimo de força e paciência. Junto com ela, todo o pessoal do laboratório, famoso LabEnz/UFS, muito bem frequentado, pelas mentes mais brilhantes do século 21, meus amores: Nikolas Chaves, Mayara Mendes e Tamires Carvalho. Não posso esquecer da galera que já passou por aqui nesses sete anos de história: Carolina Góes, Isabela Vasconcelos, Kleiton Paulo, Rafael, Camila, João, Jorge e Cleiton.

Pensando em laboratórios, não posso esquecer o professor Arie e seus orientados, Daniela, Vanderson, Luiz Fernando e José Carlos, que me ensinaram muito e me ajudaram mais ainda durante todo o mestrado.

Quero agradecer a minha família pelo apoio emocional indispensável nessa caminhada. Obrigada dona Rosângela pelo dom da vida e obrigada Dayane por ser essa pessoa maravilhosa, vocês me ensinaram a ser guerreira e não arredar o pé quando as coisas apertam.

Não posso deixar de agradecer, principalmente, aos Orixás e todos os espíritos de luz que me impulsionam nessa luta, quando muitas vezes eu não via saída. Quero agradecer a meu pai de santo Gladson Lima, por segurar minha barra quando eu estava próxima de fraquejar, razão pela qual acredito que a humanidade ainda tem salvação.

Gostaria de agradecer ao prof. Dr. Péricles Barreto Alves, a Gabriella Barroso Souza e a Cassia Sousa Ferreira, pela oportunidade de trabalhar com algo tão promissor como as chalconas.

Quero agradecer à Universidade Federal de Sergipe, ao programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, pelo conhecimento e vivência.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE FIGURAS | i |
| LISTA DE TABELAS | ii |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | iii |
| RESUMO | iv |
| ABSTRACT | v |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 6 |
| 4. ARTIGO: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE CHALCONA SOBRE FITOPATÓGENOS DO GÊNERO <i>Xanthomonas ssp.</i> | 8 |
| Resumo | 8 |
| 4.1. Introdução | 9 |
| 4.2. Resultados e Discussão | 9 |
| 4.3. Conclusões | 15 |
| 4.4. Sessão Experimental | 15 |
| 4.5. Agradecimentos..... | 19 |
| 4.6. Declaração de participação do autor..... | 19 |
| 4.7. Referências Bibliográficas | 19 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 21 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Estrutura fundamental de chalcona..... | 4 |
| 2 | Estrutura do tereftaldeído..... | 5 |
| 3 | Estrutura do diacetilbenzeno..... | 5 |

ARTIGO

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Screening da atividade antibiofilme dos derivados de chalcona(A) e bis-chalconas(B) a 200µg/mL em <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> . As colunas seguidas de mesma letra, no gráfico, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV(%), respectivamente, 29,29 e 30,18. Os testes foram feitos em triplicata..... | 14 |
| 2 | Avaliação da integridade da membrana celular de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> tratada com o derivado de chalcona C6 (2x, 1x, 1/2x, 1/4x e 1/8x CIM; CIM = 2000µg/mL), exposta por tempos (3, 6, 14 e 24h), utilizando Iodeto de Propídio como marcador de integridade. Os testes foram feitos em triplicata e os resultados submetidos à regressão não linear da porcentagem de fluorescência por log da concentração. | 15 |
| 3 | Estrutura molecular e nomenclatura dos derivados de chalcona utilizados para os testes antimicrobianos..... | 16 |
| 4 | Estrutura molecular e nomenclatura das bis-chalconas utilizados para os testes antimicrobianos..... | 17 |

LISTA DE TABELAS

| ARTIGO | | Página |
|--------|--|--------|
| Tabela | | |
| 1 | Screening da atividade antibacteriana dos derivados de chalcona a 200µg/mL..... | 10 |
| 2 | Screening da atividade antibacteriana dos derivados de bis-chalcona 200µg/mL..... | 10 |
| 3 | Concentração mínima inibitória e IC ₅₀ em µg/mL dos derivados de chalconas com melhor desempenho no screening de atividade antibacteriana (C6, C16 e B1)..... | 11 |
| 4 | Isolados de <i>Xanthomonas</i> adquiridos da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil)..... | 17 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------|--|
| FAO | Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura |
| Xoo | <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i> |
| Xoc | <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzicola</i> |
| EUA | Estados Unidos |
| Xcc | <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> |
| Est. | Estreptomicina |
| Cha. | Chalcona |
| CV(%) | Coefficiente de variação |
| D.O. | Densidade ótica (nm) |
| % <i>inb</i> | Porcentagem de inibição |
| <u>Ntrat.</u> | Média das absorvâncias de crescimento das bactérias tratadas |
| <u>Ncontr.</u> | Média das absorvâncias do crescimento das bactérias não tratadas |
| CIM | Concentração mínima inibitória |
| CV | Cristal violeta |
| % <i>fl.</i> | Porcentagem de perda da integridade, expressa em fluorescência |
| EP | Erro padrão |
| IP | Iodeto de Propídio |

RESUMO

MOUTINHO, Brenda Leite. **Atividade antimicrobiana de derivados de chalcona sobre fitopatógenos do gênero *Xanthomonas Ssp.*** São Cristóvão: UFS, 2021. 32p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

Devido à facilidade de manipulação aliada às diversas atividades biológicas relacionadas à chalcona, essa molécula caracteriza-se como uma fonte para desenvolvimento de defensivos químicos menos tóxicos, de baixo custo e eficientes contra vários tipos de doença. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de derivados de chalcona sobre cinco espécies fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Foram realizados testes de atividade antibacteriana e antibiofilme, além da avaliação do efeito do derivado de chalcona na membrana celular utilizando Iodeto de Propídio. Dentre os 16 derivados testados, o C6((*E*)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona) apresentou 100% de inibição do crescimento da *Xanthomonas campestris pv. campestris* (Xcc) na concentração de 2000 μ g/mL, sendo essa a concentração mínima inibitória (CIM). Inibição abaixo de 40 % na inibição da formação do biofilme foi observada para todas as moléculas testadas. Também foi possível observar o aumento da fluorescência do Iodeto de Propídio (IP), diretamente proporcional ao tempo de exposição e concentração do tratamento com derivado C6, sendo que cerca de 100% das células não estão saudáveis na concentração de 2xCIM (4000 μ g/mL) em 24h de incubação. Esse desempenho pode ser atribuído aos danos na membrana citoplasmática. Conclui-se que entre os 16 derivados de chalcona testados, o derivado de chalcona C6 apresentou melhor atividade antimicrobiana para três das cinco espécies testadas, enquanto que o derivado C16 apresentou melhor atividade antimicrobiana para as outras duas. Somente o derivado C6 apresentou 100% de eficiência na inibição do crescimento da Xcc na concentração 2000 μ g/mL.

Palavras-chave: bichalcona, biofilme, *Xanthomonas campestris pv. campestris*, integridade da membrana.

* Comitê Orientador: Dr^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora).

ABSTRACT

MOUTINHO, Brenda Leite. **Antimicrobial Activity of Chalcona Derivatives on Phytopathogens of the Genus *Xanthomonas ssp.*** São Cristóvão: UFS, 2021. 32p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Chalcone is a molecule that is considered a source for developing of less toxic, low cost and efficient chemical pesticides against various types of disease because it has easy manipulation and various biological activities already related. The present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of chalcone and its derivatives on five phytopathogenic species of the genus *Xanthomonas*. Antibacterial and antibiofilm activity was evaluated, and the effect of the chalcone derivative on the cell membrane was evaluated using Propidium Iodide. Among the 16 derivatives tested, C6 ((E)-1-phenyl-3- α naphthylprop-2-en-1-one) showed 100% growth inhibition of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) at a 2000 μ g/mL concentration, the minimum inhibitory concentration (MIC). Inhibition of biofilm formation was below 40% for all tested molecules. It was also possible to observe the increase in Propidium Iodide (PI) fluorescence, directly proportional to the exposure time and concentration of the treatment with C6 derivative, with about 100% of the cells with the damaged cell membrane at the concentration of 2xMIC (4000 μ g/mL) in 24 hours of incubation. In conclusion, among the 16 chalcone derivatives tested, the C6 chalcone derivative showed better antimicrobial activity for three of the five species tested, while the C16 derivative showed better antimicrobial activity for the other two. The C6 derivative showed 100% growth-inhibiting of Xcc at a concentration of 2000 μ g/mL.

Key-words: bichalcona, biofilm, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, membrane integrity.

* Supervising Committee Dr^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes - UFS (Advisor)

1. INTRODUÇÃO GERAL

As *Xanthomonas* são proteobactérias gran-negativas que pertencem ao gênero *Xanthomonas* e provocam doenças em uma ampla variedade de plantas, incluindo: tomate, couve, citrus, arroz, mandioca, ameixa, pêssigo, cana-de-açúcar, milho, maracujá, dentre outras. O estudo dessas proteobactérias se faz necessário visto que tais plantas são de grande importância comercial. Cada espécie de *Xanthomonas* é tipicamente restrita a uma ou poucas espécies de plantas hospedeiras, geralmente da mesma família botânica. Apesar de serem relevantes, muitas dessas doenças são negligenciadas, pois não acometem culturas tão significantes para indústria como as doenças de soja, por exemplo.

A infecção fitobacteriana por *Xanthomonas ssp.* ocorre através do contato entre uma superfície biótica ou abiótica contaminada com esse fitopatógeno e a superfície da planta hospedeira. Geralmente, esse tipo de bactéria se encontra envolvida por uma matriz aquosa formada principalmente por polissacarídeos, que as protegem contra dissecação e agentes antibacterianos, denominada biofilme. Caso a superfície contaminada da planta apresente aberturas, como rachaduras ou estômatos, a bactéria é liberada em sua forma móvel, infectando assim a planta hospedeira. Uma vez no interior da planta, a bactéria se reproduz e aglutina para formar novamente o biofilme (SENA-VÉLEZ, 2014). Esse processo causa obstrução dos vasos condutores e provoca os sintomas comuns a essas doenças, como clorose e necrose foliar (MORRONI *et al.*, 2013).

Os produtos usados para tratamento e controle das doenças causadas por diferentes espécies de *Xanthomonas* consistem em formulações à base de cobre e/ou antibióticos. Frequentemente estes produtos são aplicados inadequadamente, o que pode deixar resíduos nos alimentos e produzir microrganismos resistentes (AGROFIT, 2019).

Segundo dados do relatório Nacional de Vigilância em Saúde de População Exposta a Agrotóxicos, do Ministério da Saúde, cerca de 84.206 casos de intoxicação por agrotóxicos foram registrados entre 2007 e 2015 (BRASIL, 2018). Sendo assim, se faz necessário buscar produtos naturais, menos nocivos e específicos para o controle de microrganismos, tais quais as *Xanthomonas*, como alternativa em substituição aos métodos químicos atualmente utilizados.

Atualmente já existem diversas alternativas de produtos naturais registrados no Brasil que estão disponíveis no mercado e que são utilizados no controle de diferentes microrganismos, de acordo com dados da ABCBIO (Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico). Entretanto, nenhum apresenta formulações específicas para controle da formação biofilme, que é parte importante do ciclo das doenças causadas por *Xanthomonas ssp.*

Estudos recentes revelam a eficácia do uso de chalconas na redução da formação do biofilme (SINGH *et al.*, 2017), além de atividade antimalária, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiprotozoária, anti-HIV e antioxidante (SINGH *et al.*, 2014). As chalconas são compostos naturais derivados de planta, de cadeia aberta (1,3-diaril-2-propen-1-ona) com grupo carbonil α , β -insaturado, com crescente relevância acadêmica devido a sua abundância na natureza e simplicidade química, o que permite a produção de derivados complexos em laboratório (XU *et al.*, 2019). Também podemos pontuar o potencial bioativo das bis-chalconas, já que estas compartilham de características semelhantes às chalconas, incluindo atividade biológica (atividade antimalária, antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante), método de produção artificial (método de condensação de Claisen-Schmidt) e manipulação em laboratório. Podem-se observar diversas pesquisas sobre 1,4-bis-chalcones e alguns estudos sobre 1,3-bis-chalcones envolvendo micro-organismos (TUTAR *et al.*, 2018).

Portanto, devido à escassez de produtos naturais destinados ao controle de infecções causadas por organismos do gênero *Xanthomonas*, à importância da atuação da droga em diversos estágios de contaminação/infecção de doenças fitopatogênicas e à facilidade de produção e manipulação de derivados de chalcona, como também suas diversas atividades

biológicas, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de derivados de chalcona sobre cinco espécies fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Para isso foram feitos testes *in vitro* com 16 derivados de chalconas sintetizados em laboratório, a fim de determinar o derivado com melhor desempenho nos testes de atividade antibacteriana para cinco cepas do *Xanthomonas ssp*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo pesquisa realizada pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o Brasil perdeu ou desperdiçou em apenas um ano (2013), 26,3 milhões de toneladas de alimento, dos quais 10% ocorreram na época de colheita e 30% durante o transporte e armazenamento da produção, devido à ocorrência de pragas e doenças, causadas principalmente por fungos e bactérias que podem resultar na destruição total ou parcial da planta e/ou órgão comercializável (GARCIA, 2019). Dentre essas doenças, pode-se destacar o cancro, antracnose, fusariose ou murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans*), míldio (*Peronospora parasítica*), mancha de alternaria (*Alternaria brassicae*; *A. bassicicola*; *A. raphani*), podridão negra, podridão mole, entre outras. A mancha-bacteriana e a podridão negra são doenças causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas ssp.* (TIMILSINA *et al.*, 2020).

O gênero *Xanthomonas* representa um grande grupo de patógenos bacterianos gram-negativos que podem causar doenças em mais de 300 plantas tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas (HAYWARD, 2011). Caules, galhos e folhas, assim como os órgãos reprodutores como flores, brotos, frutos e sementes, podem ser colonizados por *Xanthomonas ssp.* (SHARMA; GAUTAM; WADHAWAN, 2014). Os sintomas dessas doenças podem incluir manchas, apodrecimento, hipertrofia, hiperplasia, cancos e até a morte foliar. A podridão negra apresenta sintomas característicos, como o aparecimento de lesões cloróticas em forma de “V”, iniciando-se nas margens das folhas e progredindo para o centro à medida que coloniza o tecido vascular, geralmente resultando em necrose das folhas (MORRIONI *et al.*, 2013).

Apesar de cada espécie *Xanthomonas ssp.* ser tipicamente restrita a uma ou poucas plantas, geralmente da mesma família botânica, o gênero *Xanthomonas* engloba bactérias que infectam uma ampla variedade de plantas hospedeiras. Por exemplo: a espécie *Xanthomonas oryzae* que abrange dois patovares, *oryzae* (Xoo) e *oryzicola* (Xoc), ambos infectam arroz e são agentes etiológicos da mancha bacteriana e estria foliar bacteriana, respectivamente. Essas duas patologias podem ser consideradas as mais importantes e, conseqüentemente, as mais estudadas do arroz pelo mundo devido à depreciação da produção (JI *et al.*, 2018). Um dos poucos patovares que apresenta uma ampla gama de hospedeiros é a espécie *Xanthomonas campestris pv. campestris* (Xcc). A bactéria causadora da podridão negra tem como principal hospedeiro as crucíferas, grande grupo de plantas que abrange diversas espécies cultivadas para consumo ao redor do mundo, pertencente à família *Brassicaceae* (SINGH *et al.*, 2018).

É possível ressaltar outros grandes problemas em decorrência da proliferação de doenças causadas por esse fitopatógeno: a espécie *Xanthomonas campestris pv. vasculorum* (Dye 1978), agente etiológico da estria foliar bacteriana em cana-de-açúcar. Acredita-se que essa cepa tenha sido a causa de muitas perdas de milho desde que a doença foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA) em 2014. Entretanto, com o surgimento de novos métodos de identificação, com análises filogenéticas e moleculares, foi possível diferenciar e reagrupar o micro-organismo anteriormente descrito e atribuiu-se o problema dos EUA a *Xanthomonas vasicola pv. vasculorum* (LANG *et al.*, 2017). Ainda podemos exemplificar a espécie *Xanthomonas citri ssp. Citri*, agente etiológico do cancro cítrico. Há muito tem sido uma preocupação para culturas de citrus, como laranja, devido à desvalorização e descarte do fruto devido às lesões situadas na casca. Seu primeiro registro foi no sudeste norte-americano em 1914, mas essa doença caracteriza um problema global (FERENCE *et al.*, 2018).

Tão importante quanto reconhecer os sintomas e hospedeiros das *Xanthomonas ssp.*, é compreender como a doença se espalha e instaura na planta. Inicialmente as formas livres nadantes das xantomonas, presentes no solo ou transmitidas pelo vento e chuva, entram em contato com a superfície das plantas. Nesse momento, as células se prendem e formam uma camada protetora, composta principalmente por polissacarídeos, denominada biofilme. Essa

camada permite a replicação das células e proteção contra intemperismos do ambiente. Em seguida, as células são liberadas do biofilme e colonizam a planta pelos hidatódios ou possíveis lesões. Uma vez dentro da planta, novamente é formado o biofilme, dessa vez para multiplicação celular com proteção das defesas da hospedeira. Outras bactérias também possuem dinâmica semelhante e produzem biofilme durante infecção de seus hospedeiros, como *Erwinia amylovora* e *Xylella fastidiosa* (CASTIBLANCO; SUNDIN, 2016). Tendo em vista a relevância do biofilme para o fitopatógeno, é importante o controle da formação dessa estrutura, tanto quanto o controle do desenvolvimento do microrganismo em si.

Diversas medidas são empregadas para evitar doenças causadas por xantomonas: emprego de mudas e sementes sadias, rotação de cultura, eliminação das partes/plantas contaminadas (QUEZADO-DURVAL *et al.*, 2010). Outra medida comum adotada para controlar essas doenças é a aplicação de caldas à base de cobre e antibióticos como estreptomicina e oxitetraciclina. Entretanto o uso exacerbado provoca acúmulo desse metal nos alimentos e no solo, prejudicando a saúde das plantas e dos seres que se alimentam delas, além de produzir cepas resistentes e antibióticos ineficientes (QUEZADO-DURVAL *et al.*, 2003).

Como alternativa a esse cenário, tem sido estudadas formas de controle menos nocivas e mais eficientes, com utilização de compostos naturais derivados de plantas, fungos e bactérias. No Brasil, já existem diversas alternativas de produtos naturais disponíveis no mercado e que são utilizados no controle de diferentes microrganismos, entretanto nenhuma com indicação para controle da produção de biofilme (ABC BIO, 2019). Um composto natural derivado de plantas que tem sido amplamente estudado nos últimos tempos, com ação comprovada no biofilme (SINGH *et al.*, 2017), é o grupo das chalconas.

As chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-ona) são flavonoides de cadeia aberta com grupo carbonil α , β -insaturado (Figura 1), com relevância acadêmica devido a sua abundância na natureza e simplicidade química, o que permite a produção de derivados complexos em laboratório (XU *et al.*, 2019).

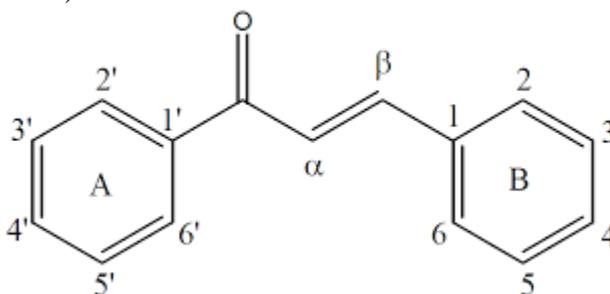


Figura 1. Estrutura fundamental de chalcona.

Na natureza, as chalconas são produzidas pela enzima chalcona sintase em plantas superiores, principalmente pelas famílias *Asteraceae*, *Moraceae*, *Fabaceae* e *Aristolochiaceae* (DÍAZ-TIELAS *et al.*, 2016). Também é possível produzir chalconas sintéticas pelo método de condensação de Claisen-Schmidt (CALVINO *et al.*, 2006). Esse método consiste em uma condensação aldólica cruzada utilizando cetonas aromáticas como reagentes para produzir aldeídos aromáticos. Geralmente são utilizados catalisadores homogêneos específicos que facilitam a separação e purificação no final da reação e obtenção das chalconas (WINTER, 2016).

As chalconas possuem diversas atividades biológicas comprovadas, como atividade bactericida, antifúngica, anti-helmíntica, inseticida, antialimentadora de insetos, antiviral, fitotóxica, entre outras, que variam conforme a composição e conformação da molécula. Além dos diversos tipos presentes na natureza, ainda não estudados, é possível confeccionar chalconas sintéticas para determinado patógeno-alvo (DÍAZ-TIELAS *et al.*, 2016).

Outros compostos com potencial bioativo, que surgiram a partir das chalconas, são as bis-chalconas. Esses compostos geralmente não são encontrados na natureza, porém podem ser sintetizados e apresentam atividade biológica como seus precursores e também tem atraído a atenção da comunidade acadêmica (TUTAR *et al.*, 2018). Dentre as atividades, podemos destacar as ações antimalária, anti-inflamatória, antibiótica e antifúngica, assim como nas chalconas. A síntese das bis-chalconas também ocorre via condensação de Claisen-Schmidt, na qual são selecionados compostos que apresentam um núcleo aromático que permite a condensação aldólica, como diacetilbenzeno (Figura 2) ou tereftaldeído (Figura 3). (DOROTEIO, 2016).

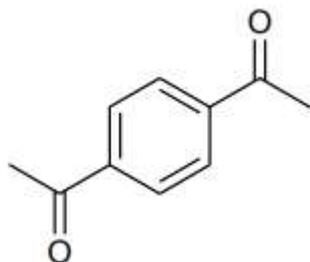


Figura 2. Estrutura do tereftaldeído.

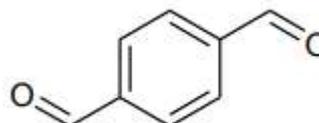


Figura 3. Estrutura do diacetilbenzeno.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCbio- Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico - Registro de biodefensivos. Disponível em: <http://www.abcbio.org.br/>. Acesso em: 05 mai 2019.

AGROFIT- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/primeira_pagina/extranet/AGROFIT.html. Acesso em: 10 jun. 2019.

CALVINO, V.; PICALLO, M.; LOPEZ-PEINADO, A. J.; MARTÍN-ARANDA, R. M.; DURÁN-VALLE, C. J. Ultrasound accelerated Claisen–Schmidt condensation: A green route to chalcones. **Applied Surface Science**, v. 252, p. 6071–6074, 2006.

CASTIBLANCO, L. F.; SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. **Jornal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 362–372, 2016.

DÍAZ-TIELAS, C.; GRAÑA, E.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. Biological Activities and Novel Applications of Chalcones. **Planta Daninha**, v. 34, n. 3, p. 607–616, 2016.

DOROTEIO, N. L. **Síntese de Análogos de Bis-chalconas Simétricos e Não Simétricos**. 2016. 88f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2016.

ERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F. I.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; JONES, J. B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 6, p. 1302–1318, 2018.

GARCIA, M. F. **Observatório do Terceiro Setor**. Brasil desperdiça 26,3 milhões de toneladas de alimentos por ano.2019 Disponível em: <https://observatorio3setor.org.br/noticias>. Acesso em: 10 jul. 2019.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: HAYWARD, A. C. *Xanthomonas*. **Dordrecht: Springer Netherlands**, p. 1-119, 1993.

JI, Z.; WANG, C.; ZHAO, K. Rice Routes of Countering *Xanthomonas oryzae*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. 3008, 2018.

LANG, J. M.; DUCHARME, E.; CABALLERO, J. I.; LUNA, E.; HARTMAN, T.; ORTIZ-CASTRO, M.; KORUS, K.; RASCOE, J.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; BROEDERS, K.; LEACH, J. E. Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. **Phytopathology**, v. 107, n. 11, p. 1312-1221, 2017.

MORRONI, I.V.; SCHINKE, C.; GERMANI, J.C. Nova proposta para uso de bacteriófagos no controle de mancha foliar em repolho causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, p.142-155, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. **Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde**, v.1, t.2, 193p. 2018.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. Mancha bacteriana: uma atualização para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. Circular Técnica, **EMBRAPA Hortaliças**, ISSN 1415-3033, 2010.

QUEZADO-DUVAL, A.M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CAMARGO, L.E.A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas spp.* associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 670-675, 2003.

SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; JOHNSON, E.; GRAHAM, J. H.; CUBERO J. Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. **Plant Pathology**, v. 64, p. 767–775, 2014. DOI: 10.1111/ppa.12311.

SHARMA, A.; GAUTAM, S.; WADHAWAN, S. ‘*Xanthomonas*’. **Encyclopedia of Food Microbiology**: Second Edition. 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00359-1.

SINGH, A.; GUPTA, R.; TANDON, S.; PANDEY, R. Thyme Oil Reduces Biofilm Formation and Impairs Virulence of *Xanthomonas oryzae*. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 1074, 2017.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. **Eur J Med Chem.**, v. 85, p. 758-77, 2014. PMID: 25137491.

SINGH, S.; DEY, S.S.; BHATIA, R.; BATLEY, J.; KUMAR, R. Molecular breeding for resistance to black rot [*Xanthomonas campestris pv. campestris* (Pammel) Dowson] in Brassicas: recent advances. **Euphytica**, v. 214, p. 196, 2018.

TIMILSINA, S.; POTNIS, N.; NEWBERRY, E. A.; LIYANAPATHIRANAGE, P.; BOCARDO, F. I.; WHITE, F. F.; GOSS, E. M.; JONES, J. B. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 18, p. 415–427, 2020.

TUTAR, U.; KOÇYIĞIT, Ü. M.; GEZEGEN, H. Evaluation of antimicrobial, antibiofilm and carbonic anhydrase inhibition profiles of 1,3-bis-chalcone derivatives. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, e22281, 2018.

WINTER, C. **Catalisadores Heterogêneos para Produção de Chalconas: Reação de Condensação de Claisen-Schmidt**. 2016. 142f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2016.

XU, M.; WU, P.; SHEN, F.; JI, J.; RAKESH, K. P. Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. **Bioorg. Chem.**, v. 91, p. 103133, 2019. PMID: 31374524.

4. ARTIGO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE DERIVADOS DE CHALCONA SOBRE FITOPATÓGENOS DO GÊNERO *Xanthomonas ssp.*

B. L. Moutinho^a, R.P. M. Fernandes^b, N. E. C. Silva^a, T.A. C. Santosa^d, G. B. Souza^b, C. S. Ferreira^b, P. B. Alves^b.

^a Laboratório de enzimologia, departamento de fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brasil

^b Laboratório de Produtos Naturais, departamento de química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brasil
email: romiranda_fernandes@yahoo.com.br, periclesbalves@gmail.com

Periódico submetido: Chemistry & Biodiversity

Devido à facilidade de manipulação aliada às diversas atividades biológicas relacionadas à chalcona, essa molécula caracteriza-se como uma fonte para desenvolvimento de defensivos químicos menos tóxicos, de baixo custo e eficientes contra vários tipos de doença. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de derivados de chalcona sobre cinco espécies fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Foram realizados testes de atividade antibacteriana e antibiofilme, além da avaliação do efeito do derivado de chalcona na membrana celular utilizando Iodeto de Propídio. Dentre os 16 derivados testados, o C6((*E*)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona) apresentou 100% de inibição do crescimento da *Xanthomonas campestris pv. campestris* (Xcc) na concentração de 2000 μ g/mL, sendo essa a concentração mínima inibitória (CIM). Inibição abaixo de 40 % na inibição da formação do biofilme foi observada para todas as moléculas testadas. Também foi possível observar o aumento da fluorescência do Iodeto de Propídio (IP), diretamente proporcional ao tempo de exposição e concentração do tratamento com derivado C6, sendo que cerca de 100% das células não estão saudáveis na concentração de 2xCIM (4000 μ g/mL) em 24h de incubação. Esse desempenho pode ser atribuído aos danos na membrana citoplasmática. Conclui-se que entre os 16 derivados de chalcona testados, o derivado de chalcona C6 apresentou melhor atividade antimicrobiana para três das cinco espécies testadas, enquanto que o derivado C16 apresentou melhor atividade antimicrobiana para as outras duas. Somente o derivado C6 apresentou 100% de eficiência na inibição do crescimento da Xcc na concentração 2000 μ g/mL.

Palavras-chaves: bis-chalcona, biofilme, *Xanthomonas campestris pv. campestris*, integridade da membrana.

4.1. Introdução

O gênero *Xanthomonas* é composto por bactérias fitopatogênicas gram-negativas que podem causar grandes perdas agroeconômicas, por exemplo, a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, causadora da murcha da banana na África Central^[1]. As doenças causadas por esses microrganismos apresentam sintomas que variam desde manchas, apodrecimento, hipertrofia, hiperplasia, cancros, até a morte do tecido^[2], podendo infectar partes vegetativas e reprodutivas da planta, em qualquer estágio de desenvolvimento, durante o plantio ou pós-colheita. A relação microrganismo-planta hospedeira das xantomonas é tipicamente restrita a uma única ou poucas plantas, a exemplo da *Xanthomonas oryzae* que abrange dois patovares, *oryzae* e *oryzicola*, ambos infectam arroz^[1]. Poucos patovares apresentam uma ampla gama de hospedeiros como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), que infecta espécies cultivadas para consumo, ornamentais e silvestres de toda a família *Brassicaceae*^[3].

O Brasil é um dos países com maior produção agrícola do mundo. Ele dispõe de uma das cinco maiores áreas destinadas à agricultura, cerca de 28 a 32% do território nacional^[4]. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), foram perdidos ou desperdiçados em um ano, 26,3 milhões de toneladas de alimento, dos quais 10% ocorreram na época de colheita e 30% durante o transporte e armazenamento da produção, devido à ocorrência de doenças e pragas^[5].

Os produtos usados para tratamento e controle das doenças causadas por diferentes espécies de *Xanthomonas* geralmente consistem em formulações à base de cobre e/ou antibióticos, estes produtos podem ser prejudiciais à saúde quando aplicados inadequadamente^[6]. Diversas alternativas para controle de fitopatógenos vêm sendo estudadas. Atualmente, já existem produtos naturais disponíveis no mercado brasileiro, provenientes do metabolismo secundário de microrganismos e plantas^[7], entretanto nenhum deles derivado de chalconas.

As chalconas são flavonoides de cadeia aberta com grupo carbonil α , β -insaturado, amplamente estudados devido a sua abundância na natureza e simplicidade química, o que permite a produção de derivados complexos em laboratório^[8]. É bem conhecido que cada modificação inserida na estrutura básica de chalcona proporciona atividades de uso terapêutico. Dentre as atividades biológicas citadas na literatura, pode-se citar ação antioxidante, antimicrobiana, anticâncer, anti-inflamatórias, antiprotozoária, entre outras^[8]. A facilidade de manipulação somada às diversas atividades biológicas caracterizam a chalcona como uma ferramenta menos tóxica, de baixo custo e poderosa contra os vários tipos de doença^[8]. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de derivados de chalcona produzidos em laboratório sobre cinco espécies fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*.

4.2. Resultados e Discussão

4.2.1 Screening da atividade antibacteriana

Foram testados 16 derivados de chalcona, sendo 11 classificados como chalcona e cinco como bis-chalconas. Os testes em xantomonas foram realizados com tratamentos à concentração de 200 μ g/mL (DMSO 2%) dos derivados chalconas e 200 μ g/mL de antibiótico Estreptomicina, concentração comumente utilizada para testes de atividade antimicrobiana.

Para três das cinco cepas de xantomonas testadas, os derivados de chalcona a 200 μ g/mL que apresentaram o melhor desempenho em valores de porcentagem de inibição, não diferiram estatisticamente dos valores do antibiótico Estreptomicina a 200 μ g/mL.

Para a cepa de *X. arboricola* pv. *melonis*, o derivado C6 a 200 μ g/mL apresentou o melhor resultado de inibição do crescimento com $70,54 \pm 4,84\%$, enquanto para a *X. axonopodis* pv. *manihotis*, o derivado C16 apresentou o melhor resultado de inibição do crescimento a 200 μ g/mL com $74,61 \pm 4,79\%$. Esses valores de porcentagem de inibição dos

derivados de chalconas diferem estatisticamente e foram superiores quando comparados com a porcentagem de inibição do tratamento com antibiótico na mesma concentração (Tabela 1).

Tabela 1. Screening da atividade antibacteriana dos derivados de chalcona a 200µg/mL.

| | <i>X. arboricola</i> <i>pv. melonis</i> | <i>X. axonopodis</i> <i>pv. manihotis</i> | <i>X. arboricola</i> <i>pv. pruni</i> | <i>X. axonopodis</i> <i>pv. vasculorum</i> | <i>X. campestris</i> <i>pv. campestris</i> |
|--------------------------------|--|--|--|---|---|
| Porcentagem de inibição | | | | | |
| Estr. | 58,28 ± 7,71 ^b | 55,70 ± 8,68 ^b | 53,58 ± 21,47 ^a | 72,26 ± 3,29 ^a | 62,91 ± 1,93 ^a |
| Cha. | 3,53 ± 2,30 ^e | 45,17 ± 1,45 ^c | 46,21 ± 6,02 ^a | 22,75 ± 3,67 ^c | 31,52 ± 1,34 ^b |
| C1 | 0,54 ± 0,54 ^e | 1,42 ± 1,42 ^e | 2,64 ± 1,40 ^b | 40,03 ± 8,16 ^b | 36,67 ± 12,58 ^b |
| C4 | 30,32 ± 0,62 ^c | 34,49 ± 4,39 ^c | 11,41 ± 5,89 ^b | 4,41 ± 4,41 ^d | 24,07 ± 1,80 ^b |
| C5 | 14,89 ± 3,47 ^d | 13,93 ± 3,82 ^d | 24,25 ± 3,29 | 0,43 ± 0,43 ^d | 19,48 ± 4,33 ^c |
| C6 | 70,54 ± 4,84 ^a | 45,26 ± 5,82 ^c | 58,77 ± 1,06 ^a | 71,54 ± 3,89 ^a | 72,73 ± 6,98 ^a |
| C8 | 9,89 ± 5,68 ^e | 1,84 ± 1,12 ^e | 7,99 ± 4,70 ^b | 5,14 ± 0,83 ^d | 12,62 ± 6,68 ^c |
| C10 | 4,33 ± 2,44 ^e | 7,74 ± 5,00 ^e | 43,74 ± 7,02 ^a | 6,80 ± 3,74 ^d | 8,58 ± 4,48 ^c |
| C11 | 5,82 ± 1,34 ^e | 20,21 ± 2,86 ^d | 1,02 ± 1,02 ^b | 13,46 ± 7,71 ^c | 27,60 ± 4,64 ^b |
| C14 | 0,00 ± 0,00 ^e | 20,58 ± 8,33 ^d | 39,66 ± 5,90 ^a | 3,00 ± 3,00 ^d | 26,56 ± 4,68 ^b |
| C16 | 51,74 ± 1,75 ^b | 74,61 ± 4,79 ^a | 69,21 ± 6,19 ^a | 72,03 ± 5,23 ^a | 82,50 ± 11,32 ^a |
| C17 | 16,90 ± 5,08 ^d | 55,33 ± 5,57 ^b | 59,71 ± 8,39 ^a | 63,42 ± 2,55 ^a | 37,82 ± 4,66 ^b |
| C19 | 0,00 ± 0,00 ^e | 34,56 ± 7,44 ^c | 44,64 ± 12,56 ^a | 17,90 ± 1,61 ^c | 41,54 ± 4,18 ^b |
| CV (%) | 24,64* | 18,60* | 24,04* | 21,27* | 16,97* |

Estr. representa o antibiótico Estreptomomicina a 200µg/mL, utilizado como controle. Cha. representa a chalcona sem modificações. *CV coeficiente de variação do Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste. Os testes foram feitos em triplicata e resultados apresentados em média ± erro padrão.

Dentre as bis-chalconas, somente o derivado B1 a 200µg/mL apresentou inibição próxima a 50%, exatamente 50,25 ± 5,2%, exclusivamente para *X. campestris pv. campestris*, resultado que não difere estatisticamente quando comparado com o antibiótico na mesma concentração. Mesmo não apresentando porcentagem de inibição próxima a 50% para as demais xantomonas, o derivado B1 a 200µg/mL apresentou 41,41 ± 1,10% de inibição para *X. axonopodis pv. manihotis* e 40,99 ± 0,80% de inibição para *X. arboricola pv. pruni*. Pode-se observar também que o derivado B5 a 200µg/mL apresenta 41,84 ± 10,75 para *X. campestris pv. campestris*. Esses resultados não diferem estatisticamente do antibiótico Estreptomomicina usado como controle. (Tabela 2).

Tabela 2. Screening da atividade antibacteriana dos derivados de bis-chalcona a 200µg/mL.

| | <i>X. arboricola</i> <i>pv. melonis</i> | <i>X. axonopodis</i> <i>pv. manihotis</i> | <i>X. arboricola</i> <i>pv. pruni</i> | <i>X. axonopodis</i> <i>pv. vasculorum</i> | <i>X. campestris</i> <i>pv. campestris</i> |
|--------------------------------|--|--|--|---|---|
| Porcentagem de inibição | | | | | |
| Estr. | 58,28 ± 7,71 ^a | 55,70 ± 8,68 ^a | 53,58 ± 21,47 ^a | 72,26 ± 3,29 ^a | 62,91 ± 1,93 ^a |
| B1 | 15,65 ± 3,89 ^b | 41,41 ± 1,10 ^a | 40,99 ± 0,80 ^a | 25,51 ± 10,64 ^b | 50,25 ± 5,29 ^a |
| B2 | 0,00 ± 0,00 ^b | 2,26 ± 2,26 ^c | 26,87 ± 12,38 ^a | 31,91 ± 10,31 ^b | 7,36 ± 4,18 ^b |
| B3 | 7,92 ± 5,72 ^b | 24,81 ± 6,55 ^b | 19,73 ± 7,02 ^a | 9,71 ± 2,58 ^c | 3,30 ± 0,81 ^b |
| B5 | 11,65 ± 6,69 ^b | 15,93 ± 4,66 ^b | 25,67 ± 3,30 ^a | 6,62 ± 2,47 ^c | 41,84 ± 10,75 ^a |
| B6 | 2,29 ± 2,29 ^b | 8,11 ± 1,01 ^c | 14,95 ± 3,70 ^a | 7,60 ± 5,24 ^c | 6,08 ± 3,20 ^b |
| CV (%) | 37,75* | 18,69* | 30,76* | 28,49* | 20,11* |

Estr. representa o antibiótico Estreptomomicina a 200µg/mL, utilizado como controle. *CV coeficiente de variação do Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste utilizado. Os testes foram feitos em triplicata e resultados apresentados em média ± erro padrão.

Já foi observada que a atividade biológica dos derivados de chalcona está relacionada às modificações na molécula^[9,11]. No caso do derivado C6, houve a incorporação de um nafitaleno (Figura 3) à molécula de chalcona, enquanto que do derivado C16, há duas metilações no anel aromático A (Figura 3). É possível observar que compostos com grupos Metil e Nafitil, os quais permitem liberação de elétrons, exibem melhor atividade antibacteriana^[9]. É importante ressaltar que o derivado B1 apresenta menor grau de complexidade e foi o único que apresentou atividade antibacteriana, ainda que inferior a alguns derivados de chalcona, diferentemente do desempenho do bis-chalconas encontrada na literatura: estudos mostram que em bis-chalconas com átomos de cloro e/ou flúor em sua composição apresentam maior atividade citotóxica contra a linhagem de células testada em comparação com outros compostos^[10] sem essas modificações, que é o caso das bis-chalconas do presente trabalho. Isso pode estar relacionado à quantidade de hidrogênios presente na cadeia, quanto mais hidrogênios menor a liposolubilidade, o que atrapalha na passagem desses compostos pela membrana das células^[11].

4.2.2 Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Foram selecionados para o experimento da concentração mínima inibitória (CIM) os derivados C6 e C16 por apresentarem porcentagem de inibição superior a 50% em todas as cepas de xantomonas testadas, e foi selecionada a bis-chalcona B1 por ter apresentado o melhor desempenho entre as bis-chalconas para comparativo em relação às chalconas simples.

O derivado C6 foi o único que apresentou inibição de 100% na concentração de 2000µg/mL, somente para a cepa de *X. campestris* pv. *campestris*. Não foi possível estabelecer a CIM dos derivados C16 e B1 dentro das concentrações testadas para nenhuma das *xanthomonas*. Entretanto a concentração necessária para reduzir em 50% a população de bactérias (IC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de dose dependência de cada composto, produzidos com as concentrações 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5µg/mL. É possível observar que para a *X. arborícola* pv. *melonis* a IC₅₀ do derivado C6 foi semelhante à IC₅₀ do antibiótico (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração mínima inibitória e IC₅₀ em µg/mL dos derivados de chalconas com melhor desempenho no screening de atividade antibacteriana (C6, C16 e B1).

| | <i>X. arborícola</i> pv. <i>melonis</i> | | <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> | | <i>X. arborícola</i> pv. <i>pruni</i> | | <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> | | <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> | |
|-------------|---|--------|--|--------|--|--------|---|--------|---|--------|
| | Concentração Mínima Inibitória / IC ₅₀ | | | | | | | | | |
| C6 | < 2000 | 163,0 | < 2000 | 257,6 | < 2000 | 402,6 | < 2000 | 546,5 | 2000 | 280,0 |
| C16 | < 2000 | 341,2 | < 2000 | 501,1 | < 2000 | 373,0 | < 2000 | 280,5 | < 2000 | 400,6 |
| B1 | < 2000 | ~7426 | < 2000 | ~ 3429 | < 2000 | ~ 3426 | < 2000 | ~ 4022 | < 2000 | ~2118 |
| Estr | 1000 | 171,58 | 1000 | 179,53 | 1000 | 186,64 | 1000 | 138,39 | 1000 | 158,96 |

Estr. representa o antibiótico Estreptomicina utilizado como controle. Os testes foram feitos em triplicata, valores de IC₅₀ obtidos através de regressão não linear da porcentagem de inibição por log da concentração.

4.2.3 Screening da atividade antibiofilme

Assim como para atividade antibacteriana, foram testados 16 derivados de chalcona, sendo 11 derivados diretos de chalcona e cinco derivados de bis-chalconas, entretanto utilizando somente a *Xcc*, pois é caracterizada como maior produtora de goma xantana, principal componente do biofilme^[12]. Nenhum dos derivados testados apresentou inibição da formação do biofilme superior a 50% na concentração de 200µg/mL. O derivado C16, apesar do bom desempenho na atividade antibacteriana, não apresentou alterações no biofilme, sendo 0 ± 0,0% a porcentagem de inibição (Figura 1.A). Em contrapartida, o derivado C10, por exemplo, inibiu cerca de 40% a formação do biofilme e teve efeito de 8,5 % na inibição do crescimento bacteriano. Esse comportamento reforça a ideia de que fatores que influenciam a

viabilidade celular podem não influenciar a formação do biofilme, como o contrário. Isso ocorre pois esses sistemas possuem regulação gênica independente e são estimulados por fatores diferentes^[13]. Ao contrário do fenômeno observado das chalconas, entre as bis-chalconas, podemos observar um desempenho semelhante do derivado B1, tanto na inibição do biofilme como na inibição do crescimento bacteriano (Figura 1.B).

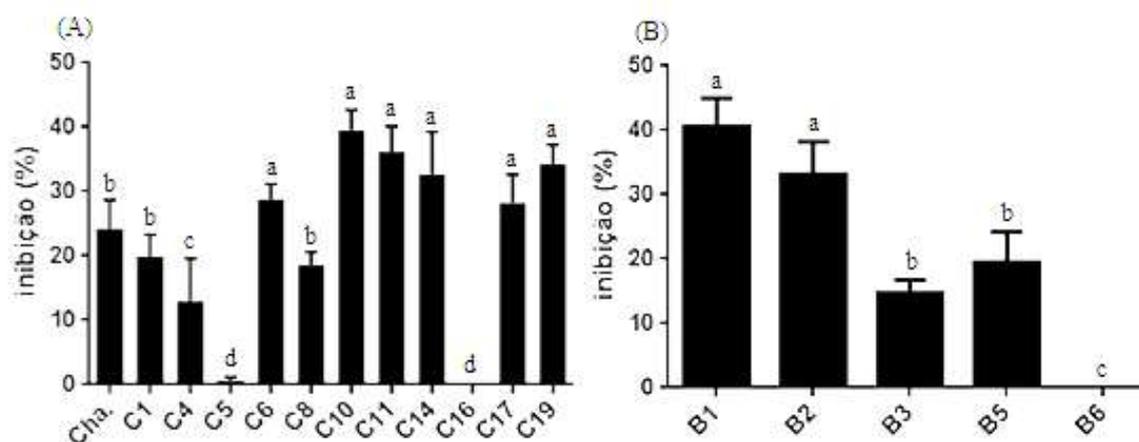


Figura 1. Screening da atividade antibiofilme dos derivados de chalcona(A) e bis-chalconas(B) a 200µg/mL em *Xanthomonas campestris pv. campestris*. As colunas seguidas de mesma letra, no gráfico, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV(%), respectivamente, 29,29 e 30,18. Os testes foram feitos em triplicata.

4.2.4 Ensaio de avaliação da integridade de membrana celular

Devido ao derivado C6 ter sido o único capaz de reduzir a 100% o crescimento bacteriano da *Xanthomonas campestris pv. campestris*, esse derivado foi utilizado para o ensaio da avaliação da integridade de membrana, sendo 2000µg/mL a concentração mínima inibitória. Com isso, foram utilizados 2x CIM, 1x CIM, 1/2x CIM, 1/4x CIM e 1/8x CIM, que correspondem às concentrações de 4000, 2000, 1000, 500 e 250µg/mL. O experimento foi realizado em quatro tempos de exposição (3, 6, 14 e 24h).

Não foi possível observar danos na membrana nos tempos 3 e 6h para as concentrações de 1/4x e 1/8x CIM. Pode-se observar o aumento da fluorescência do Iodeto de Propídio, que significa maiores danos à membrana com o aumento da dose de C6 nos tempos de 3, 6 e 14h (Figura 2.A). Contudo, o comportamento muda quando analisado somente o tempo de 24h, as doses mais baixas apresentam porcentagem de fluorescência que indicam danos na membrana semelhante entre si, enquanto que a maior dose testada, 2x CIM (4000µg/mL), apresenta fluorescência semelhante ao controle tarado com aquecimento em banho-maria (Figura 2.B). Os controles tratados somente com DMSO, na ausência de chalcona, não apresentam diferença do controle não tratado.

O Iodeto de Propídio é um fluorofóto que se liga ao DNA de fita dupla, provocando aumento da fluorescência. Entretanto, esse composto não possui transporte ativo e não consegue atravessar uma membrana celular saudável. Por isso, o aumento da fluorescência permite presumir que houve danos à membrana o suficiente para expor o DNA^[14]. Sendo assim, com a possível quantificação das células não-viáveis a partir desse método, pode-se observar que cerca de 100% das células não estão saudáveis na concentração de 2xCIM (4000µg/mL) em 24h de incubação da *Xcc* com o derivado C6.

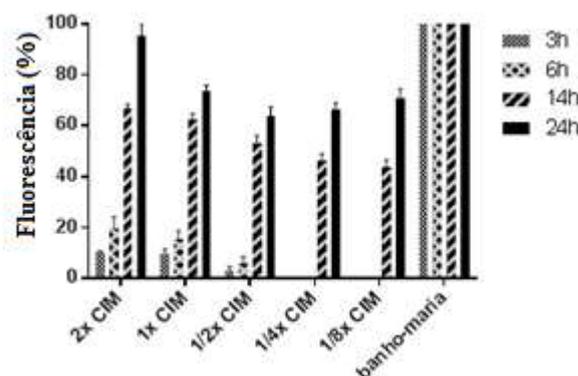


Figura 2. Avaliação da integridade da membrana celular de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* tratada com o derivado de chalcona C6 (2x, 1x, 1/2x, 1/4x e 1/8x CIM; CIM = 2000 μ g/mL), exposta por tempos (3, 6, 14 e 24h), utilizando Iodeto de Propídio como marcador de integridade. Os testes foram feitos em triplicata e os resultados submetidos à regressão não linear da porcentagem de fluorescência por log da concentração.

4.3. Conclusões

Entre os 16 derivados de chalcona testados, os derivados de chalcona B1, C6, C16 e C17 foram capazes provocar inibição no crescimento bacteriano das xantomonas superior a 50% na concentração de 200 μ g/mL. Não foi possível observar a mesma ação nos derivados testados com relação à inibição da produção de biofilme.

Quando comparado as IC_{50} , o derivado de chalcona C6 apresentou melhor atividade antimicrobiana sobre três (*X. campestris* pv. *melonis*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. axonopodis* pv. *manihotis*) das cinco espécies de *Xanthomonas* avaliadas, enquanto que o derivado de chalcona C16 apresentou melhor atividade antimicrobiana sobre as outras duas (*X. arboricola* pv. *pruni* e *X. axonopodis* pv. *vasculorum*) das cinco espécies.

Para a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, o derivado C6 apresentou 100% de eficiência na inibição do crescimento na concentração 2000 μ g/mL (CIM). Esse desempenho pode ser atribuído à perda de viabilidade celular causada por danos na membrana citoplasmática, já que podemos observar alterações na fluorescência do Iodeto de Propídio das células.

4.4. Sessão Experimental

4.4.1 Obtenção dos derivados de chalcona

Os derivados de chalcona (Figura 3) e bis-chalcona (Figura 4) foram sintetizados por condensação aldólica (condensação de Claisen-Schmidt), identificados e caracterizados como descrito em Souza^[11] no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe. Para as análises das atividades biológicas. Os derivados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%.

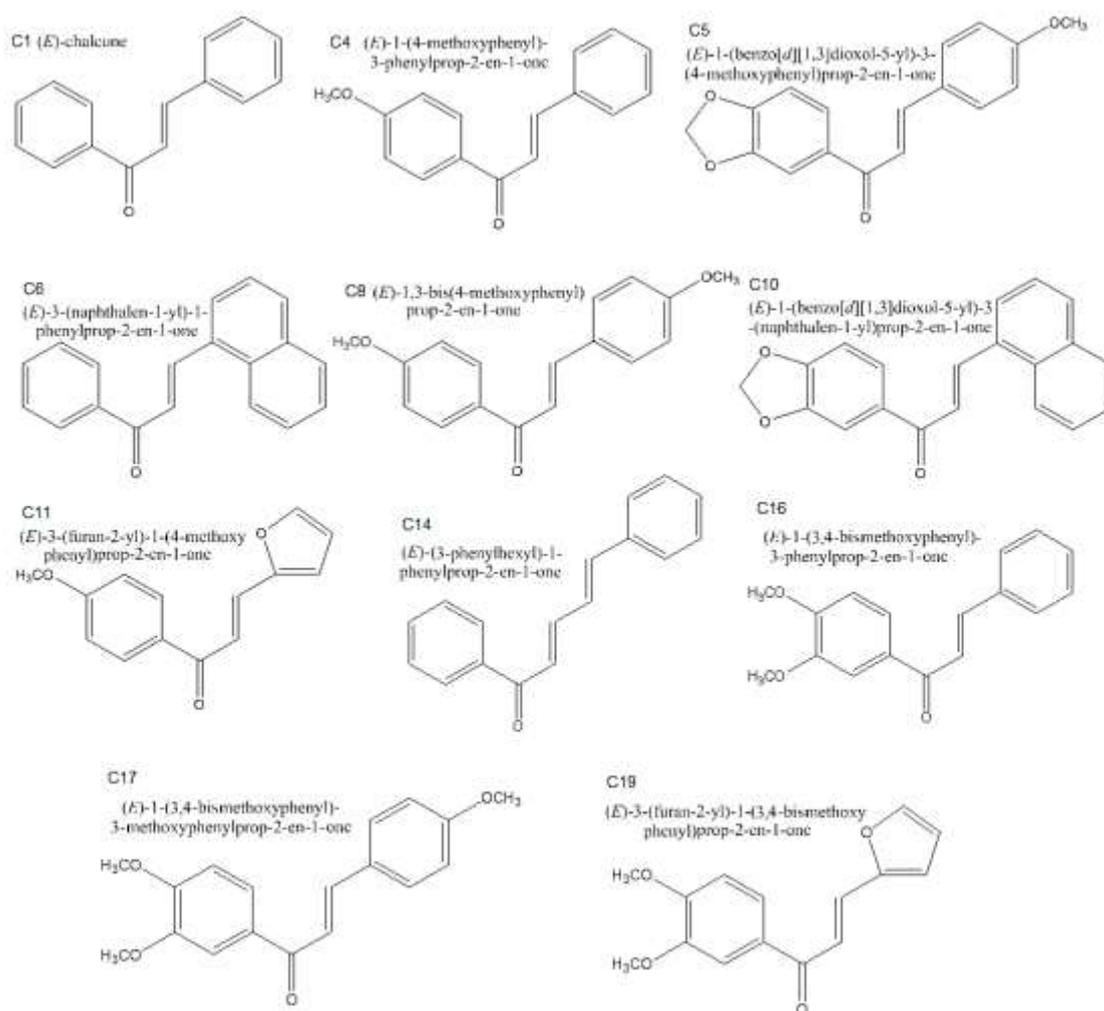


Figura 3. Estrutura molecular e nomenclatura dos derivados de chalcona utilizados para os testes antimicrobianos.

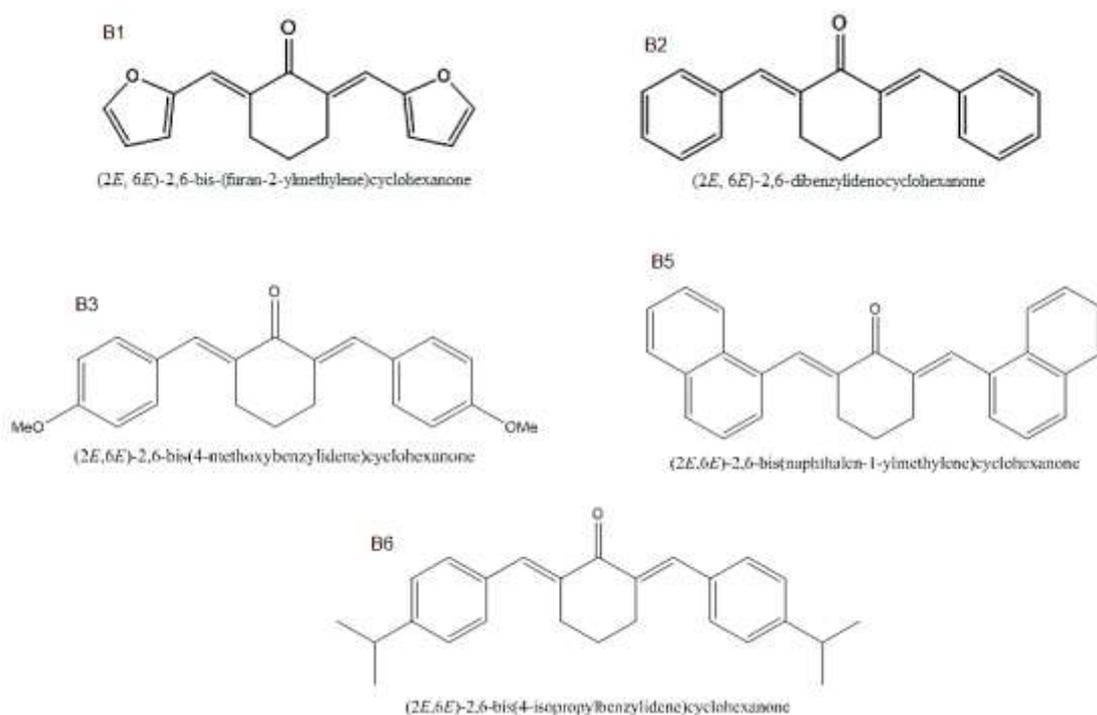


Figura 4. Estrutura molecular e nomenclatura das bis-chalconas utilizados para os testes antimicrobianos.

4.4.2 Condições de crescimento dos microrganismos

Os cinco isolados de *Xanthomonas* (Tabela 4) foram adquiridos da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil). As bactérias foram cultivadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ em meio de cultura NYG (0,3% extrato de levedura; 0,5% peptona bacteriológica; 2% de glicerol) sob agitação orbital (150 rpm).

Tabela 4. Isolados de *Xanthomonas* adquiridos da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil).

| Nº isolado | Identificação | Hospedeiro alvo |
|------------|---|-----------------------|
| 68 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i> | melão |
| CA-110 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | crucíferas |
| 1182 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> | mandioca |
| 1948 | <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> | ameixa, pêsego |
| 1970 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> | cana-de-açúcar, milho |

4.4.3 Screening da atividade antibacteriana

Para os testes iniciais de atividade antimicrobiana foram utilizadas placas de 24 poços estéril (KASVI®), onde foram pipetados 500µL das chalconas 200µg/mL (DMSO 2%) total no poço. Em seguida, foram adicionados 500µL de um inóculo padronizado de cultura de células dos fitopatógenos-alvo com densidade óptica (D.O.) medida em espectrofotômetro a 600nm em aproximadamente 0,6. Posteriormente, as placas foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, por 24hrs em agitação orbital 150rpm. Após incubação, uma alíquota 200µL das amostras foi transferida para placas de 96 poços estéril (KASVI®) e medida absorbância em espectrofotômetro a 600nm para análise do crescimento. Como controles experimentais, foram utilizados o antibiótico Estreptomicina na concentração 200µg/mL e o fitopatógeno não tratado. Os dados foram expressos em porcentagem de inibição (% *inb*), relativizados segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inb} = \frac{N_{\text{trat.}}}{N_{\text{contr.}}} * 100$$

onde, $N_{\text{trat.}}$ corresponde à média das absorvâncias de crescimento das bactérias tratadas com os derivados das chalconas, $N_{\text{contr.}}$ corresponde à média das absorvância do crescimento do controle (bactérias não tratadas). Os testes foram feitos em triplicata, os resultados foram submetidos ao Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e apresentados em média \pm erro padrão.

4.4.4 Concentração Mínima Inibitória (CIM) e IC₅₀

Para determinação da concentração mínima inibitória (CIM) foram selecionados os derivados de chalcona com melhor desempenho no *screening*, responsável por maior porcentagem de inibição. Foi utilizado o método de diluições seriadas, em microplacas de 24 poços estéril (KASVI®), pela pipetagem de 500 μ L da solução dos derivados de chalcona com concentrações variando de 2000 (DMSO 2%), 1000, 500, 250, 125 e 62,5 μ g/mL, totais no poço. Em seguida, os poços foram inoculados às placas incubadas e as amostras analisadas como descrito anteriormente no item 3. Os testes foram feitos em triplicata e os valores de IC₅₀ obtidos através da submissão à regressão não linear dos valores médios das porcentagens de inibição do crescimento por log da concentração.

4.4.5 Screening da atividade antibiofilme

Para os testes de atividade antibiofilme foi utilizada *Xanthomonas* CA-110. Em placas de 24 poços estéril (KASVI®) foram pipetados 500 μ L dos derivados de chalcona 200 μ g/mL (DMSO 2%). Em seguida, foram adicionados 500 μ L de um inóculo padronizado de cultura de células dos fitopatógenos-alvo com densidade óptica (D.O.) medida em espectrofotômetro a 600nm em aproximadamente 0,6. Posteriormente, as placas foram incubadas a 30°C \pm 2, por 24hrs sem agitação orbital. Após incubação, as placas foram centrifugadas a 3700rpm por 5min, em seguida foi retirado o sobrenadante e adicionado 1mL de metanol e incubado a 4°C por 15 minutos. Subsequentemente, foi retirado o metanol, a placa foi seca à temperatura ambiente e adicionado 1mL de cristal violeta (CV) 0,1% por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o CV foi retirado, a placa foi lavada com água destilada para retirar o excesso do cristal. O CV aderido ao biofilme foi solubilizado em DMSO 100%, uma alíquota de 200 μ L foi transferida para placas de 96 poços e analisada a absorbância em espectrofotômetro a 595nm. Como controle experimental foi utilizado o fitopatógeno não tratado. Os dados foram expressos em porcentagem de inibição como descrito anteriormente no item 3. Os testes foram feitos em triplicata, os resultados foram submetidos ao Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e apresentados em média \pm erro padrão.

4.4.6 Ensaio de avaliação da integridade de membrana celular

Para análise da integridade da membrana celular foi utilizada a *Xanthomonas* CA-110 (Xcc). Em placas de 24 poços estéril (KASVI®) foram pipetados 500 μ L de uma diluição referente a 2x, 1x, 1/2x, 1/4x e 1/8x a concentração mínima inibitória do derivado da chalcona com melhor desempenho no teste de CIM, responsável por porcentagem de inibição superior a 85%, e inoculados com 500 μ L de cultura de células de CA-110. As placas foram incubadas por 3, 6, 14 e 24horas. Após incubação, as amostras foram centrifugadas, lavadas com tampão fosfato-salino (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na₂HPO₄ e 0,24 g/L de KH₂PO₄ pH 7.4) e incubadas com Iodeto de Propídio (IP 3mM) a 30°C por 15 minutos no escuro. Como controles experimentais foram utilizados o fitopatógeno não tratado e o fitopatógeno com tratamento térmico (banho-maria a 100°C por 15 minutos). Em seguida, uma alíquota de 200 μ L foi transferida para placas de 96 poços estéril (KASVI®) e analisada a fluorescência em espectrofotômetro a 488/645nm (excitação/emissão). Os dados foram expressos em porcentagem de perda da integridade, expressa em fluorescência (% *fl.*) e relativizados segundo a fórmula:

$$\% fl. = \frac{Ntrat.}{Ncontr.} * 100$$

onde, *Ntrat.* corresponde à média de fluorescência do tratamento, *Ncontr.* corresponde à média de fluorescência do controle com tratamento térmico. Os testes foram feitos em triplicata e os resultados foram submetidos à regressão não linear dos valores médios das porcentagens de fluorescência por log da concentração.

4.4.7 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram feitos em triplicata repetidos em três experimentos independentes em dias diferentes e plotados como média ± EP (erro padrão). Os dados de dose-dependência foram submetidos ao teste de regressão no software GraphPadPrism (ver. 7, CA, San Diego, USA, 2012) e os dados dos *screening* foram submetidos ao teste de média Scott-Knott a 5% de probabilidade no software (ver. 5.6, DEX-UFLA, 2015), com coeficiente de variação (CV %) transformados pela fórmula:

$$CV (\%) = \sqrt{Y + 1.0 - \text{SQRT}(Y + 1.0)}.$$

4.5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brasil e à Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE) – Brasil pelo financiamento. Ao Instituto Biológico de São Paulo – Brasil pelas fitobactérias do gênero *Xanthomonas* avaliadas.

4.6. Declaração de Participação do Autor

Brenda L. Moutinho, Roberta P. M. Fernandes, Nikolas E. C. Silva, Tamires A. C. Santos, Gabriella B. Souza, Cassia S. Ferreira, Péricles B. Alves desenvolveram o presente estudo.

Brenda L. Moutinho e Nikolas E. C. Silva realizaram os testes de atividade antibacteriana e antibiofilme.

Tamires A. C. Santos e Roberta P. M. Fernandes realizaram os teste de integridade da membrana celular.

Gabriella B. Souza e Péricles B. Alves produziram e disponibilizaram os derivados de chalcona.

Cassia S. Ferreira e Péricles B. Alves produziram e disponibilizaram os derivados de bis-chalcona.

4.7 Referências

- [1] S. Timilsina, N. Potnis, E. A. Newberry, P. Liyanapathirana, F. I. Bocado, F. F. White, E. M. Goss, J. B. Jones, ‘Xanthomonas diversity, virulence and plant–pathogen interactions.’ *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, 18, 415–427.
- [2] V. Marroni, J. C. Germani, C. Schinke, ‘Nova proposta para uso de bacteriófagos no controle de mancha foliar em repolho, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*’. *Revista Brasileira de Agroecologia.* **2013**, 8, 1.
- [3] S. Singh, S.S. Dey, R. Bhatia, J. Batley, R. Kumar, ‘Molecular breeding for resistance to black rot [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson] in Brassicas: recent advances’. *Euphytica.* **2018**, 214, 196.
- [4] E. D. Assad, L. C. Costa, S. Martins, M. Calmon, R. Feltran-Barbieri, M. Campanili, C. A. Nobre, Papel do Plano ABC e do Planaveg na adaptação da agricultura e da pecuária às mudanças climáticas. Working Paper. *Embrapa Agricultura Digital.* **2019**, São Paulo, Brasil: WRI Brasil. Disponível online em: <https://wribrasil.org.br/pt/publicacoes> Acesso em: 15 dez. 2019
- [5] <https://observatorio3setor.org.br/noticias/brasil-desperdica-26-milhoes-de-toneladas-de-alimentos-por-ano/> Acesso em: 10 jul. 2019

- [6] http://agrofit.agricultura.gov.br/primeira_pagina/extranet/AGROFIT.html. Acesso em: 10 jun. 2019.
- [7] <http://www.abcbio.org.br/>. Acesso em: 05 mai 2019.
- [8] M. Xu, P. Wu, F. Shen, J. Ji, K. P. Rakesh, 'Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development.' *Bioorg. Chem. Epub.* **2019**, 91, 103133.
- [9] SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V.; 'Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review.' *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 6, 85, 758-77.
- [10] U. Tutar, Ü. M. Koçyiğit, H. Gezezen, 'Evaluation of antimicrobial, antibiofilm and carbonic anhydrase inhibition profiles of 1,3-bis-chalcone derivatives', *J. Biochem Mol Toxicol.* **2018**, e22281.
- [11] M. Alidmat, M. Khairuddean, S. Salhimi, & M. Al-Amin, 'Docking studies, synthesis, characterization, and cytotoxicity activity of new bis-chalcones derivatives'. *Biomedical Research and Therapy.* **2021**, 8(4), 4294-4306.
- [12] D. S. Menezes, J. I. Druzian, F. F. Padilha, R. R. Souza, 'Produção Biotecnológica de Goma Xantana em Alguns Resíduos Agroindustriais, Caracterização e Aplicações'. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental.* **2012**, 8, 8, 1761-1776.
- [13] Singh, R. Gupta, S. Tandon, R. Pandey, 'Thyme Oil Reduces Biofilm Formation and Impairs Virulence of *Xanthomonas oryzae*', *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 1074.
- [14] W. A. Dengler, J. Schulte, D. P. Berger, R. Mertelsmann, H. H. Fiebig, 'Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays', *Anti-Cancer Drugs.* **1995**, 6, 4, 522-532.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do ponto de vista tecnológico e econômico, o presente estudo apontou um derivado promissor, o C6((*E*)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona), passo inicial e essencial para futura produção e comercialização de um produto natural de uso agrícola à base de chalconas. Para tanto, se faz necessário estudos futuros com essa molécula, tanto em outros organismos, como avaliação da melhor forma de aplicação nas plantas infectadas.

Do ponto de vista ambiental, o presente estudo apontou um produto natural derivado de plantas como potencial ação antibacteriana, que favorece o uso de recursos naturais renováveis, de fácil produção, derivado de plantas. Com isso, será possível reduzir, futuramente, os resíduos de agrotóxicos que são prejudiciais aos seres vivos e ao meio ambiente, devido aos químicos presentes nos alimentos, solo e água.